

## INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
International application No. PCT/DE98/01409
International filing date (day/month/year) 22 May 1998 (22.05.98)

Applicant's or agent's file reference  
K 2559

Priority date (day/month/year)  
23 May 1997 (23.05.97)

Applicant LITTLE, Melvyn et al
-----------------------------------

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 December 1998 (16.12.98)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Kari Huynh-Khuong  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/

# PCT

## KAPITEL II

### ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:  
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts K 2559
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01409	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22.5.1998	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 23.5.1997
Bezeichnung der Erfindung Mutierter OKT3-Antikörper		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben.)  Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg		Telefonnr.:  Telefaxnr.:  Fernschreibnr.:  DE
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben.)  LITTLE, Melvyn Fritz-von-Briesen-Str. 10 D-69151 Neckargemünd		
Staatsangehörigkeit (Staat): GB	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben.)  KIPRIYANOV, Sergey Furtwänglerstr. 3 69121 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): RU	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

**Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER***Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.*Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

MOLDENHAUER, Gerhard  
 Brückenstr. 41  
 D-69120 Heidelberg

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

 Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

**Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT**

Die folgende Person ist  Anwalt  gemeinsamer Vertreter  
 und  ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.  
 wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.  
 wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben.)</i>	Telefonnr.:
<b>Dr. Andrea Schüßler</b>	Telefaxnr.:
<b>HUBER &amp; SCHÜSSLER</b> Patentanwälte · Patent Attorneys Truderinger Straße 246 · 81825 München Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49	Fernschreibnr.:

Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

**Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN**

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde\*

- i)  die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii)  die Änderungen nach Artikel 34
  - der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
  - der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
  - der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
 berücksichtigt.
- iii)  die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv)  die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v)  den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

\* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

**Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN**

- Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (*das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind*) ausgenommen .....

*(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*

**Feld Nr. VI KONTROLLISTE**

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

## 1. Änderungen nach Artikel 34

Beschreibung : Blätter  
Ansprüche : Blätter  
Zeichnungen : Blätter

## 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34

3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 : Blätter  
4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 : Blätter  
5. Sonstige (*einzelne aufzuführen*) : Blätter

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- |  |  |
|--|--|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht        | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung          |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht            | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige ( <i>einzelne aufzuführen</i> ): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | Scheck   |

**Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETER**

*Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.*

Dr. Andrea Schüßler

München, 16.12.1998

Patentanwältin

— Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen —

## 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

## 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b.:

3.  Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.  Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4.  Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5.  Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHEIDIGT.

— Vom Internationalen Büro auszufüllen —

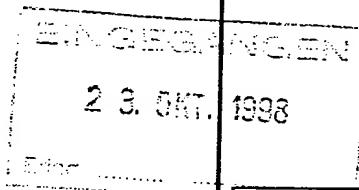
Antrag vom IPEA erhalten am:

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
UF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An

HUBER, Bernard  
Huber & Schüssler  
Truderinger Strasse 246  
D-81825 München  
GERMANY



**PCT**

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES  
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS  
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

*21. 12. 1998*

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2559</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Punkt 1 und 4 unten
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/01409</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	<b>22/05/1998</b>
Anmelder <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG . . . .</b>		

1.  Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

**Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:**

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

**Bis wann sind Änderungen einzureichen?**

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

**Wo sind die Änderungen einzureichen?**

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34. CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20.  
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

**Nähere Hinweise** sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2.  Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.
3.  **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
- der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt werden
  - noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 b bzw. 90c3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter <b>Dominique Parijs</b>
---	--

## **ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA**

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.  
Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

### **HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19**

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprache wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

#### **Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?**

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

#### **Bis wann sind Änderungen einzureichen?**

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

#### **Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?**

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

#### **In welcher Form können Änderungen erfolgen?**

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchesblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu nummerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

**Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.**

#### **Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?**

##### **Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):**

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

**Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.**

## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:  
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:  
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:  
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt."Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:  
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

### "Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

### Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

### Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amts sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnnte beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) K 2559

## Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Mutierter OKT3-Antikörper

## Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

 Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
D - 69120 Heidelberg (DE)

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

## Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

 nur Anmelder Anmelder und Erfinder nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

GB

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

## Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:  Anwalt  gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Telefonnr.:

49 89 / 4272 4748

HUBER, Bernard

Telefaxnr.:

49 89 / 4272 4749

Patentanwälte Huber &amp; Schüßler

Fernschreibnr.:

Truderinger Str. 246

D - 81825 München (DE)

Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KIPRIYANOV, Sergey  
Furtwänglerstr. 3  
D - 69121 Heidelberg (DE)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

RU

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MOLDENHAUER, Gerhard  
Brückenstr. 41  
D - 69120 Heidelberg (DE)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

 alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

**Regionales Patent**

- AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guineia, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

**Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien .....                          | <input type="checkbox"/> LT Litauen .....   |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien .....                          | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg .....                                       |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich .....                        | <input type="checkbox"/> LV Lettland .....  |
| <input type="checkbox"/> AU Australien .....                        | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....                                 |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan .....                     | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar .....                                      |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina .....               | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien ..... |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados .....                          | <input type="checkbox"/> MN Mongolei .....  |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien .....                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi .....  |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien .....                         | <input type="checkbox"/> MX Mexiko .....  |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus .....                           | <input type="checkbox"/> NO Norwegen .....  |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada .....                            | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....                                      |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein .....  | <input type="checkbox"/> PL Polen .....   |
| <input type="checkbox"/> CN China .....                             | <input type="checkbox"/> PT Portugal .....  |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba .....                              | <input type="checkbox"/> RO Rumänien .....  |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik .....             | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....                            |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland .....                       | <input type="checkbox"/> SD Sudan .....   |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark .....                          | <input type="checkbox"/> SE Schweden .....  |
| <input type="checkbox"/> EE Estland .....                           | <input type="checkbox"/> SG Singapur .....  |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien .....                           | <input type="checkbox"/> SI Slowenien .....                                       |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland .....                          | <input type="checkbox"/> SK Slowakei .....  |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich .....            | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                                    |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien .....                          | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....                                   |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana .....                             | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....                                    |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia .....                            | <input type="checkbox"/> TR Türkei .....  |
| <input type="checkbox"/> GW Guineia-Bissau .....                    | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....                             |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn .....                            | <input type="checkbox"/> UA Ukraine .....   |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien .....                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda .....  |
| <input type="checkbox"/> IL Israel .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .....       |
| <input type="checkbox"/> IS Island .....                            | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....                  | <input type="checkbox"/> VN Vietnam .....   |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia .....                             | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....                                     |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....                       | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....  |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea ..... |   |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea .....                    |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....                        |   |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                       |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                         |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia .....                           |   |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho .....                           |   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- .....
- .....
- .....

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von .....

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

**Feld Nr. VI PRIORITYANSPRUCH**Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. 

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) <b>DEUTSCHLAND</b>	23. Mai 1997 (23.05.97)	197 21 700.1	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE**

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / **EPA**

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt): Datum (Tag/Monat/Jahr): Aktenzeichen:

**Feld Nr. VIII KONTROLLISTE**

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

- |                    |   |                   |
|--------------------|---|-------------------|
| 1. Antrag          | : | 4 Blätter         |
| 2. Beschreibung    | : | 7 Blätter         |
| 3. Ansprüche       | : | 2 Blätter         |
| 4. Zusammenfassung | : | 1 Blätter         |
| 5. Zeichnungen     | : | 3 Blätter         |
| <b>Insgesamt</b>   | : | <b>17 Blätter</b> |

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

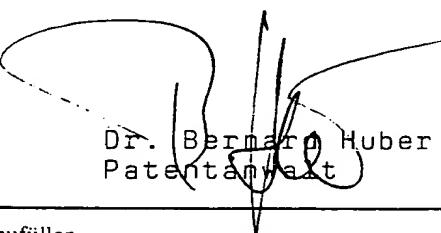
- |   |  |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht                                       | 5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung                                      |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht   | 6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen                               |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift                                | 7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)                 |
| 4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen): | 8. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzel aufführen): Text für Priobelag Scheck Nr. 2003061127 |

Abbildung Nr. \_\_\_\_\_ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

**Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 22. Mai 1998



Dr. Bernhard Huber  
Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen einge-gangen: <input type="checkbox"/>
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	nicht ein-gegangen: <input type="checkbox"/>
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde:	ISA / 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

# PCT

## BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	K 2559	Internationales Aktenzeichen
		Eingangsstempel des Anmeldeamts
Anmelder <b>Deutsches Krebsforschungszentrum</b>		
<b>BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN</b>		
1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR	150,00	T
2. RECHERCHENGEBÜHR	2.200,00	S
Die internationale Recherche ist durchzuführen von <b>EPA</b> (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)		
3. INTERNATIONALE GEBÜHR		
<b>Grundgebühr</b> Die internationale Anmeldung enthält <u>17</u> Blätter.		
umfaßt die ersten 30 Blätter	800,00	b <sub>1</sub>
Anzahl der Blätter x Zusatzblattgebühr über 30	=	b <sub>2</sub>
Addieren Sie die in Feld b <sub>1</sub> und b <sub>2</sub> eingetragenen Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein		
800,00 B		
<b>Bestimmungsgebühren</b> Die internationale Anmeldung enthält <u>3</u> Bestimmungen.		
3 x 184,00	=	552,00 D
Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühr		
Bestimmungsgebühren (maximal 11)		
Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein (Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Erniedrigung der internationalen Gebühr um 75%. Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzuragende Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)		
4. GEBÜHR FÜR PRIORITYSBEGELEITUNG	35,00	P
5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN	3.737,00	
Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge, und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein		
INSGESAMT		
<input type="checkbox"/> Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.		
<b>ZAHLUNGSWEISE</b>		
<input type="checkbox"/> Abbuchungsauftrag (siehe unten)	<input type="checkbox"/> Bankwechsel	<input type="checkbox"/> Kupons
<input checked="" type="checkbox"/> Scheck Nr. 2003061137	<input type="checkbox"/> Barzahlung	<input type="checkbox"/> Sonstige (einzelnen angeben):
<input type="checkbox"/> Postanweisung	<input type="checkbox"/> Gebührenmarken	

### ABBUCHUNGSAUFTAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

- Das Anmeldeamt/  wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.
- wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.
- wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.  
PCT/DE 98/01409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (Classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, vol. 10, no. 4, April 1997, pages 445-453. XP002079905 Oxford, GB see the whole document ----- -/-	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "U" document which may throw doubts on one or more claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in contact with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1998

Date of mailing of the international search report

21/10/1998

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooitj, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/DE 98/01409

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 196, no. 1, 13 September 1996, pages 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL cited in the application see "Material & Methods" ---	1-11
A	S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, no. 1, 30 September 1994, pages 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL cited in the application see tables ---	1-11
A	WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22 December 1994 see table 8 see claims ---	1-11
A	WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8 December 1994 see the whole document ---	1-11
A	D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 9, no. 11, November 1992, pages 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland see the whole document ---	1-11

BEST AVAILABLE COPY

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/DE98/01409**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See Additional Matter PCT/ISA/210

2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/DE98/01409

Although Claims 10 (fully) and 11 (in part) relate to a method for treatment of the human or animal body, and although Claim 11 (in part) relates to a diagnostic method which is carried out on the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

**BEST AVAILABLE COPY**

BEST AVAILABLE COPY

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE 98/01409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9429350	A 22-12-1994	US 5747654	A	05-05-1998
		AT 169932	T	15-09-1998
		AU 682705	B	16-10-1997
		AU 7246494	A	03-01-1995
		CA 2164984	A	22-12-1994
		DE 69412614	D	24-09-1998
		EP 0703926	A	03-04-1996
		JP 9502862	T	25-03-1997
WO 9428027	A 08-12-1994	AU 7098094	A	20-12-1994
		CA 2163989	A	08-12-1994
		EP 0700402	A	13-03-1996
		JP 9501824	T	25-02-1997

**PCT** WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/574</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/52975</b></p>
		<p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>26. November 1998 (26.11.98)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE98/01409</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>22. Mai 1998 (22.05.98)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 21 700.1      23. Mai 1997 (23.05.97)      DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergey [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE). MOLDENHAUER, Gerhard [DE/DE]; Brückenstrasse 41, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüßler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		
<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>		
<p>(54) Title: MUTATED OKT3 ANTIBODY</p> <p>(54) Bezeichnung: MUTIERTER OKT3-ANTIKÖRPER</p> <p>(57) Abstract The invention relates to an H100A position point-mutated OKT3 antibody, and to a method for the production and use thereof.</p> <p>(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Mutierter OKT3-Antikörper**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine  
5 Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer  $\epsilon$ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., *Science* 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., *J. Immunol.* 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., *Eur. J. Immunol.* 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außerdem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thistlethwaite et al., *Transplantation* 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., *Transplantation* 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannelli et al., *J. Immunol. Meth.* 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxische T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten (Nitta et al., *Lancet* 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., *Bio/Technology* 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Woodle et al., *J. Immunol.* 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., *Human. Antibod. Hybridomas*, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten  
10  
15  
20  
25  
30

- 2 -

rekombinanten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

10 Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

15 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomzellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der  $\kappa$ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der  $\kappa$ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der  $\gamma$ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

20  
25  
30 Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

- 3 -

- kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden v<sub>H</sub>-Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.
- Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.
- Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BI21 und SG 13009, den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

- inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden inseriert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist 5 im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.
- 10 Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner 15 ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumorpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine 20 oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

- 25 Fig. 1: Plasmid pHOG21  
wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:
- |                   |  |
|-------------------|--|
| Ap <sup>R</sup> : | Ampicillin-Resistenzgen  |
| c-myc:            | Sequenz codierend für ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Großbritannien) erkannt wird |
| ColE1:            | Ursprung der DNA-Replikation   |

- 5 -

	fI IG:	Intergene Region des f1-Phagen
	His <sub>6</sub> :	Sequenz codierend für 6 Histidinreste
	linker:	Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die v <sub>H</sub> - und v <sub>L</sub> -Domäne verbindet
5	peIB:	Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase
	P/O:	Wildtyp-Lac-Promotor/Operator

- Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten OKT3-Einzelkettenantikörpers
- 10 Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3 und anti-CD19
- 15 Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

#### **BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

Die Isolation von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ-Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ-Kette hybridisieren, hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ-Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet. Das 50 µl Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 µM jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer Mannheim), 5 µg BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen

- 6 -

je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIA-quick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

5 Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden  $\nu_H$ -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von 10 Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

15 Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT<sub>GA</sub>) bei 37°C wachsengelassen. 20 Verdünnungen (1:50) der Übernachtkulturen in 2xYT<sub>GA</sub> wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachsengelassen. Sobald die Kulturen OD<sub>600</sub> = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten und 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50 $\mu$ g/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine 25 Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5% 30 des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spherozlasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Über-

- 7 -

stand und die Spherozysten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfielen. Der vorstehend auf Eis aufbewahrte Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 µm und dann 0,2 µm wurde das Volumen 5 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule 10 von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni<sup>2+</sup> und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein 15 weiter auf einer Mono S Ionenaustrauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für einen längere Aufbewahrung wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

**Patentansprüche**

5

1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.

10

2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.

3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.

15

4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

20

a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA

b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,

25

c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,

30

d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 9 -

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

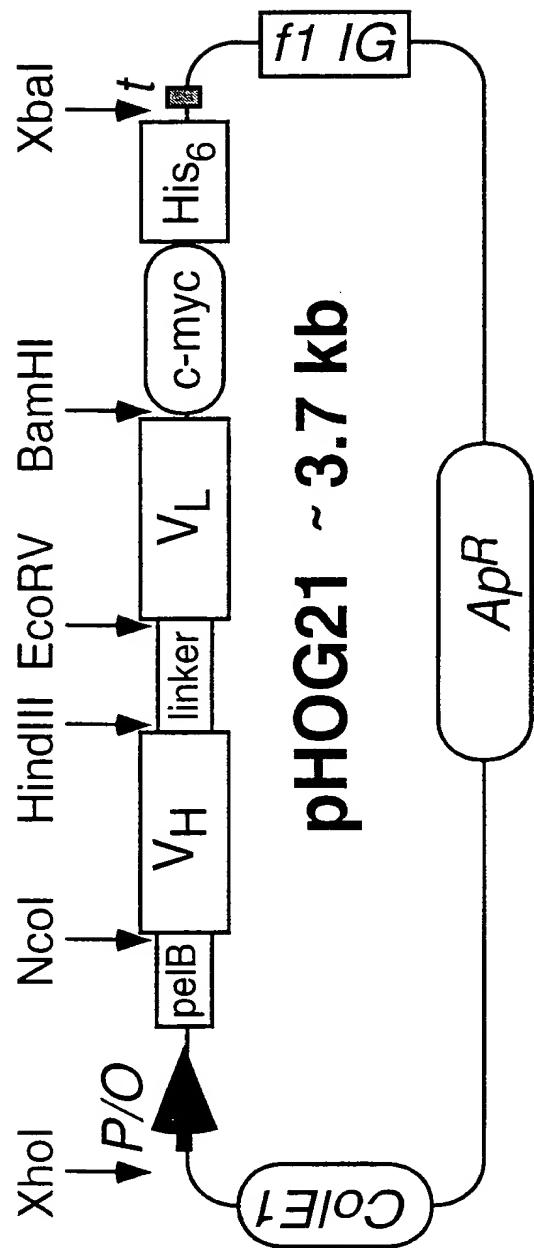


Fig. 1

EcoRI                    RBS                    PeiB leader  
 131 GAATTCAATTAAAAGAGGAGAAATTAACC**ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCT**  
 12► M K Y L L P T A A A G  
 PstI  
 NcoI                •            Pvull            VH anti-CD3  
 192 TGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAA  
 12► L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E  
 Frame-H1  
 254 CTGGCAAGACCTGGGCCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAG  
 33► L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T R  
 CDR-H1    Frame-H2  
 316 GTACACGATGCACTGGTAAAACAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGAACA  
 53► Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y  
 CDR-H2  
 375 TTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCA  
 73► I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A  
 Frame-H3  
 429 CATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAG  
 91► T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E  
 PstI    CDR-H3  
 491 GACTCTGCAGTCTATTACTGTCCAAGAATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTAC  
 112► D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y  
 Frame-H4    CH1                              HindIII                      Yol linker  
 548 TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCAGCCAAAACAACACCCAGCTTGAGAAGG  
 131► W G Q G T T L T V S S A K T T P K L E E G  
 EcoRV  
 MluI                    VL anti-CD3                                      Frame-L1  
 610 TGAATTTCAGAACGACGCGTAGATATCGTGCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT  
 151► E F S E A R V D I V L T Q S P A I M S A  
 PstI    CDR-L1  
 672 CTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGA  
 172► S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M  
 Frame-L2    CDR-L2  
 729 ACTGGTACCAAGCAGAACAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTGACACATCCAAA  
 191► N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K  
 Frame-L3  
 788 CTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGCAGTGGCTGGGACCTTACTCTC  
 211► L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L  
 CDR-L3  
 848 ACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG  
 231► T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S  
 Frame-L4    C kappa  
 907 TAACCCATTCACGTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACTGCACC  
 250► N P F T F G S G T K L E I N R A D T A P  
 BamHI                    c-myc epitope                                      His6 tail  
 967 AACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATC  
 270► T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H  
 XbaI  
 1029 ACTAATCTAGA  
 291► H •

Fig. 3

**BgIII** RBS Pel B leader

1 AGATCTATTAAAAGAGGAGAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGC  
 1► M K Y L L P T A A A G L  
 Ncol ◆ VH anti-CD19 Frame-H1

65 TGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGT  
 13► L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V  
 CDR-H1

129 GAGGCCTGGTCCTCAGTGAAGATTCTGCAGGCTCTGGCTATGCATTCAGACTACTG  
 34► R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W  
 Frame-H2

192 GATGAACTTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACCAGATTGGCCT  
 55► M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W P  
 CDR-H2

253 GGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCA  
 76► G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A  
 Frame-H3

310 GACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGGGTCT  
 95► D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V  
 CDR-H3

374 ATTTCTGTGCAAGACCGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACT  
 116► Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y A M D  
 Frame-H4 CH1 Linker

431 ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCCCAAAACAACACCCAAGCTTGGCGGT  
 135► Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G  
 VL anti-CD3 Frame-L1

493 GATATCGTGTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGAGAAGGTACCATGA  
 156► D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M  
 CDR-L1 Frame-L2

557 CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTACATGAACTGGTACCACCAGAAGTCAGGCACC  
 177► T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T  
 CDR-L2

616 TCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTC  
 197► S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F  
 Frame-L3

676 AGGGGCAGTGGTCTGGACCTCTTACTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTG  
 217► R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A  
 CDR-L3 Frame-L4

740 CCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCACGTTCGGCTCGGGACAAAG  
 238► A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K  
 C kappa c-myc epitope

799 TTGGAAATAACCGGGCTGACTGCACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAA  
 258► L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S E  
 His6 tail XbaI

859 GAAGACCTAAACTCACATACCATCACCATCATAATCTAGA  
 278► E D L N S H H H H H H H H \*

Fig. 3 (Fortsetzung)

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/574</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/52975</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>26. November 1998 (26.11.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE98/01409</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>22. Mai 1998 (22.05.98)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>197 21 700.1 23. Mai 1997 (23.05.97) DE</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergey [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE). MOLDENHAUER, Gerhard [DE/DE]; Brückenstrasse 41, D-69120 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüßler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: MUTATED OKT3 ANTIBODY

(54) Bezeichnung: MUTIERTER OKT3-ANTIKÖRPER

(57) Abstract

The invention relates to an H100A position point-mutated OKT3 antibody, and to a method for the production and use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
IM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2559</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/ 01409</b>	Internationales Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr) <b>22/05/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/05/1997</b>
Anmelder <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM STIFTUNG . . . . .</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3.  In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
  - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
  - wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 

Abb. Nr. \_\_\_\_\_  wie vom Anmelder vorgeschlagen  keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 98/01409

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
  
siehe Weitere Angaben PCT/ISA/210
  
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl die Ansprüche 10 (völlig) und 11 (teilweise) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, und obwohl der Anspruch 11 (teilweise) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

DE 98/01409

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, Bd. 10, Nr. 4, April 1997, Seiten 445-453, XP002079905 Oxford, GB siehe das ganze Dokument ---	1-11
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie.

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7. Oktober 1998

21/10/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

DE 98/01409

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 196, Nr. 1, 13. September 1996, Seiten 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL in der Anmeldung erwähnt siehe "Material & Methods" ---	1-11
A	S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 175, Nr. 1, 30. September 1994, Seiten 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL in der Anmeldung erwähnt siehe Tabellen ---	1-11
A	WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22. Dezember 1994 siehe Tabelle 8 siehe Ansprüche ---	1-11
A	WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8. Dezember 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, Bd. 9, Nr. 11, November 1992, Seiten 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland siehe das ganze Dokument -----	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

DE 98/01409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9429350	A 22-12-1994	US AT AU AU CA DE EP JP	5747654 A 169932 T 682705 B 7246494 A 2164984 A 69412614 D 0703926 A 9502862 T	05-05-1998 15-09-1998 16-10-1997 03-01-1995 22-12-1994 24-09-1998 03-04-1996 25-03-1997
WO 9428027	A 08-12-1994	AU CA EP JP	7098094 A 2163989 A 0700402 A 9501824 T	20-12-1994 08-12-1994 13-03-1996 25-02-1997

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

3-T

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>K 2559</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/DE98/01409</b>	International filing date (day/month/year) <b>22 May 1998 (22.05.1998)</b>	Priority date (day/month/year) <b>23 May 1997 (23.05.1997)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C07K 16/28</b>		
Applicant <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>16 December 1998 (16.12.1998)</b>	Date of completion of this report <b>20 July 1999 (20.07.1999)</b>
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/01409

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-7, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-11, filed with the letter of 28 June 1999 (28.06.1999),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 98/01409**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 11	YES
	Claims	---	NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 11	YES
	Claims	---	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 9	YES
	Claims	10?, 11?	NO

**2. Citations and explanations****a) Novelty and inventive step**

None of the prior art documents discloses or suggests the subject matter of the present claims. Claims 1 - 11 therefore appear to comply with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

Document D1 (Protein Engineering, 10(4), 1997, 445 - 453) does not appear to be part of the prior art but was obviously made available to the public only on 2 June 1997, that is, after the priority date (23 May 1997) of the present application. If, however, it should be found in a subsequent European examination phase that D1 was already available to the public beforehand or that the priority claim is not valid, D1 would become relevant for the assessment of the novelty of all the claims.

D1 discloses an Fv fragment which is derived from the monoclonal antibody OKT3 and in which the cysteine in the H100A position is replaced by serine (see the abstract and page 446, left column). Since the sequence of OKT3 is also known (see Figure 2), D1 discloses all the features of Claims 1 - 3.

... / ...

(Continuation of V.2)

All the method steps of Claims 4 - 9 are likewise contained in D1 in the chapter "Materials and methods" on page 445 and in the left column on page 446.

D1 additionally discloses in the introductory portion (see page 445, right column) that the unmodified OKT3 antibody is used to inhibit transplant rejection and in tumour therapy. The problem that was solved in D1 was to develop an OKT3 derivative which is more stable and easier to produce and whose affinity is unchanged (see the abstract and the first paragraph of the introductory portion). For a person skilled in the art, the teaching that the modified OKT3 fragment also be used for said purposes would therefore be derivable directly and unambiguously from the context of D1.

**b) Industrial applicability**

The PCT does not contain clear-cut criteria for assessing whether the present Claims 10 and 11 are industrially applicable. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/DE 98/01409**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The use of the modified OKT3 fragment according to Claims 10 and 11 is not supported by the description, in contravention of the requirements of PCT Article 6.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

REC'D 22 JUL 1999

WIPO

PCT

**PCT**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2559</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE98/01409</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>22/05/1998</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>23/05/1997</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C07K16/28</b>		
Anmelder <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM STIFTUNG .....</b>		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I  Grundlage des Berichts
- II  Priorität
- III  Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V  Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI  Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII  Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII  Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags <b>16/12/1998</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>20.07.99</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   <b>Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465</b>	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>von Ballmoos, P</b>  <b>Tel. Nr. (+49-89) 2399 8174</b>



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01409

## I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-7                    ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-11                    eingegangen am                    30/06/1999 mit Schreiben vom            28/06/1999

### Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3                    ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung,                    Seiten:  
 Ansprüche,                    Nr.:  
 Zeichnungen,                    Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	---
Erforderliche Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	---
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	10?-11?

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01409

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in voller Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**Teil V**

**a) Neuheit und erfinderische Tätigkeit**

Keines der Dokumente aus dem Stand der Technik offenbart den Gegenstand der vorliegenden Ansprüche oder legt ihn nahe. Die Ansprüche 1-11 scheinen deshalb die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT zu erfüllen.

Dokument D1 (Protein Engineering, 10(4), 1997, 445-453) scheint nicht zum Stand der Technik zu gehören, sondern ist offensichtlich erst am 2. Juni 1997, also nach dem Prioritätstag (23. Mai 1997) der vorliegenden Anmeldung, der Öffentlichkeit zugänglich gemacht worden. Sollte sich jedoch in einer eventuellen späteren europäischen Prüfungsphase herausstellen, dass D1 der Öffentlichkeit schon früher zugänglich war oder dass der Prioritätsanpruch nicht gerechtfertigt ist, würde D1 relevant für die Beurteilung der Neuheit aller Ansprüche.

D1 offenbart nämlich ein Fv Fragment, das vom monoklonalen Antikörper OKT3 abgeleitet ist und dessen Cystein an Position H100A durch Serin ausgetauscht ist (siehe Zusammenfassung und Seite 446, linke Spalte). Da die Sequenz von OKT3 ebenfalls bekannt ist (siehe Figur 2), offenbart D1 alle Merkmale der Ansprüche 1-3 .

Alle Verfahrensschritte gemäss der Ansprüche 4-9 sind in D1 ebenfalls enthalten im Kapitel "Materials and methods" auf Seite 445 und in der linken Spalte von Seite 446.

D1 offenbart ausserdem in der Einleitung (siehe Seite 445, rechte Spalte), dass der unveränderte OKT3 Antikörper Anwendung findet bei der Verminderung einer Transplantatabstossung sowie in der Tumortherapie. Die Aufgabe, die in D1 gelöst wurde, war, ein stabileres und einfacher zu produzierendes OKT3 Derivat mit unveränderter Affinität zu entwickeln (siehe Zusammenfassung und erster Paragraph der Einleitung). Für den Fachmann würde deshalb aus dem Kontext von D1 unmittelbar und eindeutig die Lehre hervorgehen, das veränderte OKT3 Fragment ebenfalls zu den genannten Verwendungszwecken heranzuziehen.

**b) Gewerbliche Anwendbarkeit**

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 10 und 11 gewerblich anwendbar sind, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**Teil VIII**

Die Verwendung des veränderten OKT3 Fragments gemäss den Ansprüchen 10 und 11 ist, entgegen den Erfordernissen von Art. 6 PCT, von der Beschreibung nicht gestützt.

K 2559

**Patentansprüche**

1. Monoklonaler Antikörper bzw. Fragment davon gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.
- 5 2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.
- 10 3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.
- 15 4. Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers oder Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA
  - 20 b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,
  - c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,
  - 25 d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in  
5 Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in  
10 Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die  
15 Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.

10. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder Fragments  
15 davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung  
oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen  
Organtransplantatempfänger.

11. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder Fragments  
20 davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der  
Tumordiagnostik oder -therapie.

K 2559

**Patentansprüche**

1. Monoklonaler Antikörper bzw. Fragment davon gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.  
5
2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.
3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.  
10
4. Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers oder Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:  
15
  - a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA
  - b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,  
20
  - c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,  
25
  - d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.  
30
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.

5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.

10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.

15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.

10 10. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.

20 11. Verwendung des monoklonalen Antikörpers oder Fragments davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

Unser Zeichen: K 2559

### Mutierter OKT3-Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine  
5 Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer  $\epsilon$ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., Science 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol. 10 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außerdem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301  
15 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thist-lethwaite et al., Transplantation 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine  
20 T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannelly et al., J. Immunol. Meth. 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxi-sche T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten  
25 (Nitta et al., Lancet 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Wood-le et al., J. Immunol. 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human. Antibod. Hybridomas, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3  
30 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten

rekombinannten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

5 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

10 Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

15 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die 20 für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der  $\kappa$ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der  $\kappa$ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die 25 variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der  $\gamma$ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

30 Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden v<sub>H</sub>-Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.

10

Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment insertiert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.

20

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BI21 und SG 13009, den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden inseriert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumorpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1: Plasmid pHOG21

wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:

Ap<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenzgen

c-myc: Sequenz codierend für ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Großbritannien) erkannt wird

ColE1: Ursprung der DNA-Replikation

- 5 -

	fI IG:	Intergene Region des f1-Phagen
	His <sub>6</sub> :	Sequenz codierend für 6 Histidinreste
	linker:	Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die v <sub>H</sub> - und v <sub>L</sub> -Domäne verbindet
5	pelB:	Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase
	P/O:	Wildtyp-Lac-Promotor/Operator

Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten  
OKT3-Einzelkettenantikörpers

10 Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3  
und anti-CD19

15 Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

#### **BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

20 Die Isoloation von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3  
und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175,  
S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der  
leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer  
Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ-Kette  
und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ-Kette hybridisieren,  
hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA,  
die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4,  
der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ-Kette hybridisiert  
(Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region  
der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114  
25 (1995), verwendet. Das 50 µl Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers  
und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 µM jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer  
Mannheim), 5 µg BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen  
30

je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIA-quick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

- 5 Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden  $\nu_H$ -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die  
10 Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte  
15 Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996)) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als NcoI/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT<sub>GA</sub>) bei 37°C wachsen gelassen.  
20 Verdünnungen (1:50) der Übernachtkulturen in 2xYT<sub>GA</sub> wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Sobald die Kulturen OD<sub>600</sub> = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten und 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50 $\mu$ g/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine  
25 Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5%  
30 des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spherozlasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Über-

stand und die Spherozlasten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfielen. Der vorstehend auf Eis aufbewahrte Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 µm und dann 0,2 µm wurde das Volumen 5 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule 10 von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni<sup>2+</sup> und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein weiter auf einer Mono S Ionenaustauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für einen längere Aufbewahrung 15 wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

K 2559

**Patentansprüche**

5

1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.

10

2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.

3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.

15

4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

20

a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA

25

b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,

30

c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,

35

d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

- 10 -

K 2559

**Zusammenfassung**

5

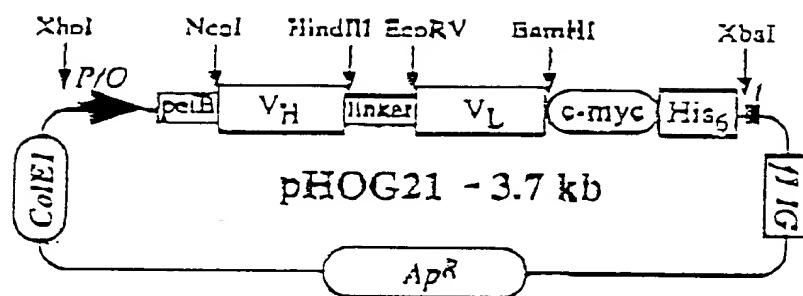
**Mutierter OKT3-Antikörper**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

09/424705

ECR VOL 1 S 09/04/96

Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

697424705

[View all posts](#)

EcoRI RBS PeI B leader  
 131 GAATTCAATTAAAGAGGAGAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTG  
 1 M K Y L L P T A A A G L L L L  
 PstI  
 NcoI • Pvull VH anti-CD3 Frame-H1  
 203 GCAGCTCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGCTCA  
 16 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S  
 CDR-H1  
 275 GTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTACTAGTACACCGATGCACTGGTAAAACAGAGGC  
 40 V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H W V K Q R  
 Frame-H2  
 345 CTGGACAGGGCTGGAATGGATACATTAACTCCTAGCCGCTGGTTAACTAATTACAATCAGA  
 63 P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q  
 Frame-H3  
 411 AGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAACTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGACAGCAGCCTG  
 85 K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L  
 PstI CDR-H3  
 482 ACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACT  
 109 T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y  
 Frame-H4 CH1 HindIII Yol linker  
 549 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCACGGCCAAACACACCCAAAGCTTGAAACAAGGTGAATTTCAG  
 131 W G Q G T T L T V S S A K T T P K L E E G E F S  
 EcoRV  
 MluI VL anti-CD3 Frame-L1  
 621 AAGCACGGGTAGATATCCTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCA  
 155 E A R V D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T  
 PstI CDR-L1 Frame-L2  
 693 TGACCTGCAGTGCCAGCTCAACTGTAAGTTACATGAACTGGTACCCAGGAGAAGTCAGGCACCTCCCC  
 179 M T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P  
 CDR-L2 Frame-L3  
 760 CAAAAGATGGATTTTGACACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGAAGGTCACCA  
 201 K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G S G S  
 829 TGGGACCTCTTACTCTCACAAATCAGGCCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGT  
 224 G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q  
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa  
 900 GGAGTAGTAACCCATTCACGTTCGCTGGGACAAACTGGAAATAAACCCGGCTGATACTCCACCA  
 248 W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A P  
 BamHI c-myc epitope His6 tail XbaI  
 969 CTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA  
 271 T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H H H

Fig. 2

**BEST AVAILABLE COPY**

09/424705

Fig. 3

Diabody of anti-CD19 and anti-CD3 (mutated OKT3)

EcoRI RBS PstI leader  
 1 (GAATTCAATTAAAGAGGGAAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCAACGGCCTGGCTTGCGCTGGCAGCT  
 1' MetLys-Tyr-LeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuAlaAla  
 NcoI + VH anti-CD3 Frame-H1  
 79 CAGCCCGCCATGCCGCAGGTGCAGCTGCACCACTGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGCTCAGTGAAGATGTCC  
 18 ▶ GluProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer  
 CDR-H1 Frame-H2  
 157 TCCAAAGGCTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGCTAAACAGAGGCTGGACAGGGCTGGAA  
 14 ▶ CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu  
 CDR-H2  
 232 TGGATTGGATAACATTAATCTAGCCGTGGTTACTAATTACAAATCAGAAAGTTCAAGGACAAGGCCACA  
 59 ▶ TrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThr  
 Frame-H3  
 301 TTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCTACATGCAACTGAGCACCGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCATTAC  
 92 ▶ LeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGluLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr  
 CDR-H3 Frame-H4  
 379 TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTIONACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCCTCAG  
 115 ▶ CysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrSerLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSerA  
 CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1  
 453 CCAAAACAAACACCCAAAGCTTGGCGGTATATCTCTACACCAACTCCAGCTCTTGGCTGIGCTCTAGGGCAG  
 142 ▶ IaLysThrThrProLysLeuGlyAspIleLeuLeuThrGlnThrProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGln  
 CDR-L1  
 529 AGGGCCACCACCTCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGCTGTTGATTATGATGGTGTAGTTATTGAACTGGTAC  
 168 ▶ ArgAlaThrIleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrLeuAsnTyrPheG  
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3  
 599 AACAGATTCAGGACAGCCACCCAAACTCTCACCTATGATGATCCAACTCTAAGTTCTGGATGCCACCCAGG  
 191 ▶ IleLeuProGlyGlnProProLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnLeuValSerGlyIleProProArg  
 673 TTIAGTGGCAGTGGCTGGGACAGACTTCACCTCACATCCATCTGAGAAGGGTGGATGCTGCACACTATCAC  
 216 ▶ PheSerGlySerGlyThrAspPheIleLeuAsnIleAlaProValGluLysValAspAlaAlaThrTyrHis  
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa NotI  
 731 TGTCAGCAAAGTACTGAGGATCCCTGGGCTGGAGGGCACCAAGCTGGAAATCTAACGGGATGATCTGG  
 242 ▶ CysGlnGlnSerThrGluAspProTyrThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla  
 o-myc epitope His6 tail BgIII  
 267 ▶ AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHis...  
 RBS PstI B leader  
 899 CTATTAAGAGGGAGAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCAACGGCCTGGCTCAGTGGCAGCTCAGC  
 1 ▶ MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnP  
 NcoI + VH anti-CD19 Frame-H1  
 977 CGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGCTCAGTGAAGATTCTGCA  
 13 ▶ IeAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGlnLeuValArgProGlySerSerValLysIleSerCysL  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 1055 AGGCTCTGGCTATGCAATTGAGCTACTGGATGAACTGGTGAGGCAAGGAGGGCTGGACAGGGCTTGGAGTGG  
 45 ▶ ysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSerTyrTrpMetAsnTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpI  
 CDR-H3 Frame-H4  
 1130 TTGGACAGATTGGCTGGAGATGGTACTAACTACAAATGCAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGA  
 70 ▶ IaGlyGlnIleTrpProGlyAspGlyAspThrAsnTyrAsnGlyLysPheLysGlyLysAlaThrLeut  
 Frame-H3  
 1199 CTGCAGGAAATCTCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCACCTAGCATCTGAGGACTCTGGGTCTATTCTGTG  
 93 ▶ IaAlaAspGluSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuAlaSerGluAspSerAlaValTyrPheCysA  
 CDR-H3 Frame-H4  
 1277 CAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGGCTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGCTAAGGAACCTCACT  
 119 ▶ IaArgArgGluThrThrValGlyArgTyrTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerVa  
 CH1 Linker VL anti-CD3 Frame-L1  
 1347 CACCGTCTCTCAGCCAAACACACCCAAAGCTGGCGGTATGCTCACTGCTCAGGAAATCAGTCCTG  
 142 ▶ IThrValSerSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerA  
 CDR-L1 Frame-L2  
 1424 CATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGACCTGCAAGTGCCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCGCA  
 168 ▶ IaSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnGln  
 CDR-L2 Frame-L3  
 1497 GAACTCAGGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCTGCTCACTTCA  
 192 ▶ IaLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValProAlaHisPheA  
 1571 GGGGAGTGGCTCTGGCACCTTAACTCTCTCACAAATCAGGGCCTGGAGAGCTGCTGCCACTTATTACTGCA  
 217 ▶ TrpGlySerGlyThrSerTyrSerLeuIleSerGlyMetGluAlaGluAspAlaAlaThrTyrTyrCysG  
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa  
 1549 AGCAGTGGAGTACTAACCAATTCACTGTTGGCTGGGACAAAGTTGGAAATTAACGGGCTGATCTGG  
 243 ▶ IaGlnTrpSerSerAsnProPheThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluIleAsnArgAlaAspThrAlaPr  
 o-myc epitope His6 tail XbaI  
 1722 ACTGGATCCGAACTAACCTGATCTCAGAAAGAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCAATCTAGA  
 267 ▶ IThrGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHis...

BEST AVAILABLE COPY